Formosan Entomologist
Journal Homepage: entsocjournal.yabee.com.tw

Differentiation of Mallada basalis (Walker) and Mallada desjardinsi (Navás) (Neuroptera: Chrysopidae) by 18S rRNA 【Research report】

以18S rRNA區分基徵草蛉Mallada basalis (Walker) 及安平草蛉Mallada desjardinsi (Navás) (脈翅目：草蛉科)【研究報告】

Shu-Chen Chang*, Chiu-Tung Lu
張淑貞* 盧秋通

*通訊作者E-mail : scchang@wufeng.tari.gov.tw

Received: 2007/10/18 Accepted: 2007/12/19 Available online: 2007/12/01

Abstract

Mallada basalis (Walker) and Mallada desjardinsi (Navás) have been studied as biological control agents in Taiwan. Of the two green lacewings, Mallada basalis is being mass reared and used in pest control in Taiwan. Molecular techniques were applied to characterize these two green lacewings. Their partial 18S rRNA was amplified by polymerase chain reaction. The pairwise similarity of sequences from the two species was 0.97. PCR with species-specific primers based on 18S rRNA sequences provided partial 18S products of 950 and 826 bp differentiates, allowing these two species to be readily visualized after electrophoresis. Such species-specific PCR could be used to evaluate individuals for contamination during mass rearing of Mallada basalis, or to confirm the identity of field-collected specimens.

摘要

曾於台灣生物防治上研究過之草蛉有基徵草蛉Mallada basalis (Walker) 及安平草蛉Mallada desjardinsi (Navás)，前者在台灣目前被大量飼養應用於田間防治害蟲。運用分生技術可區分這兩種草蛉，以PCR放大此兩種草蛉的部分18S rRNA，其序列相似值為 0.97。依據其序列差異處，設計具種專一性引子，可各自增幅放大此二種草蛉之專一性DNA片段，長度各為 950及826 bp，可於電泳圖上清楚分辨。此具種專一性聚合酶連鎖反應方法，可應用於基徵草蛉室內大量飼養及自田間採集草蛉更新室內品系時，監控、確認草蛉種類。

Key words: Mallada basalis, Mallada desjardinsi, 18S rRNA, species-specific PCR

關鍵詞: 基徵草蛉、安平草蛉、18S rRNA、具種專一性聚合酶連鎖反應。

Full Text: PDF(0.74 MB)

下載其它卷期全文 Browse all articles in archive: http://entsocjournal.yabee.com.tw

台灣昆蟲 27: 327-339 (2007)
Formosan Entomol. 27: 327-339 (2007)

以18S rRNA區分基徵草蛉*Mallada basalis* (Walker) 及安平草蛉*Mallada desjardinsi* (Navás) (脈翅目：草蛉科)

張淑貞* 盧秋通 行政院農業委員會農業試驗所應用動物組 臺中縣霧峰鄉中正路189號

摘 要

曾於台灣生物防治上研究過之草蛉有基徵草蛉 *Mallada basalis* (Walker) 及安平草蛉 *Mallada desjardinsi* (Navás)，前者在台灣目前被大量飼養應用於田間防治害蟲。運用分生技術可區分這兩種草蛉，以 PCR 放大此兩種草蛉的部分 18S rRNA，其序列相似值為 0.97。依據其序列差異處，設計具種專一性引子，可各自增幅放大此二種草蛉之專一性 DNA 片段，長度各為 950 及 826 bp，可於電泳圖上清楚分辨。此具種專一性聚合酶連鎖反應方法，可應用於基徵草蛉室內大量飼養及自田間採集草蛉更新室內品系時，監控、確認草蛉種類。

關鍵詞：基徵草蛉、安平草蛉、18S rRNA、具種專一性聚合酶連鎖反應。

前 言

草蛉爲廣食性之捕食性昆蟲，分類地位上爲脈翅目 (Neuroptera)、草蛉科 (Chrysopidae)，已知種類近 1200 種 (Brooks and Barnard, 1990)，台灣並無相關調查文獻，曾於生物防治上研究過的則有基徵草蛉 (*Mallada basalis* (Walker)) 及安平草蛉 (*Mallada desjardinsi* (Navás)) (Lee and Shih, 1981; Nee, 1983; Wu, 1992, 1995; Chang and Huang, 1995; Lu and Wang, 2006)。其幼蟲迅猛，素有蚜獅之稱，獵捕吸食體型微小、柔軟之昆蟲 (Ridway and Murphy, 1984)，應用於害蟲生物防治時，常以卵或初齡幼蟲釋放於田間。釋放於田間的草蛉，除了幼蟲有同類相殘習性外 (Mochizuki *et al*., 2006)，生長各期尙會遭遇寄生蜂的威脅 (Chou and Wu, 1988; Kabissa *et al*., 1996; Ruberson *et al*., 1995)，難以持續發揮捕食害蟲的效果。田間防治時，多以持續定期釋放來壓抑害蟲。目前在台灣被大量飼養且實際應用於害蟲防治上者爲基徵草蛉 (Hao, 2002)，並已有民間公司量產販售。

草蛉除傳統以外部形態進行分類外，早期也曾使用蛋白質電泳分析草蛉各種及小種間的遺傳距離 (Cianchi and Bullini, 1992; Wells, 1994; Mouloud, *et al*., 2002)。隨著 PCR 技術的發展及進步，DNA 在昆蟲分類

*論文聯繫人
e-mail: scchang@wufeng.tari.gov.tw

上的應用也愈形普遍，核醣體是細胞內的重要胞器，雌雄間無差異，大部分動物細胞基因體 DNA (genomic DNA) 中，有 100 至 500 套核醣體 DNA (rDNA) 轉錄單位 (transcription unit)，數量多、較易取得進行研究，且兼具序列高度保守之 18S、5.8S、28S rRNA 及序列變異性較大之轉錄間隔區 (transcribed spacer) ITS1、ITS2 (Hoy, 1994)。如應用序列高度保守之 18S、28S rRNA，探討昆蟲各目間及完全變態類昆蟲的親緣關係 (Chalwatzis *et al.*, 1996; Kjer, 2004; Whiting *et al.*, 1997; Whiting, 2002a, b)；以核醣體 18S rRNA、轉譯延長因子 (translation elongation factor-1α)及粒線體 16S rRNA、細胞色素氧化酵素 (cytochrome c oxidase subunit 3) 等片段序列，分析脈翅目的系統發生 (phylogney) 狀況 (Haring and Aspöck, 2004)。因應天敵大量飼養時種類監控所需，也可以核醣體 ITS1 及粒線體 12S rRNA 鑑定寄生蜂及捕植蟎 (Chang *et al.*, 2001; Jeyaprakash and Hoy, 2002)。

基徵草蛉廣泛分布於日本、台灣、菲律賓、密克羅尼西亞、玻里尼西亞、夏威夷及澳洲，安平草蛉分布於日本、台灣、Chagos 群島、衣索匹亞區 (Tsukaguchi, 1995)，二者生態棲位 (niche) 相同，外形相似，不易區分。今擬以農業試驗所 (TARI，以下簡稱農試所) 室內飼養族群爲基本材料，根據其 18S rRNA 序列，建立專一性引子，並瞭解此專一性引子在田間族群的適用性，及其序列變異狀況，藉以應用於例行室內飼養及更新室內品系時，草蛉種類監控所需。此外在查對此 2 種草蛉的物種學名過程中，發現以往我國學者將 *Mallada boninensis* Okamoto, 1914 視爲安平草蛉之種名 (species name) (Lee and Shih, 1981; Nee, 1983; Chang, 2000)，然而此一種名已在 Hölzel and Ohm (1992) 的研究報告中修訂爲 *Mallada desjardinsi* (Navás, 1911) 的同物異名 (synonym)，爲於科學研究及田間實質運用上能正確的使用安平草蛉種名，特於此提出。

材料與方法

一、供試蟲體

基徵草蛉及安平草蛉蟲源來自農試所室內以微膠囊人工飼料 (Lee, 1994) 飼養的族群，農試所 1989 年於室內建立此 2 種草蛉之初，曾請草蛉分類學者日本大阪大學 Tsukaguchi 博士確認其學名，此後一直隔離於室內飼養，不曾加入田間族群，1998 年再送請 Tsukaguchi 博士鑑定一次，仍確定無誤。另取新竹峨眉草蜻蛉自然農業有限公司 (Lacewing Natural Agriculture Co., Taiwan) 在室內以外米綴蛾 *Corcyra cephalonica* (Stainton) 卵飼養的草蛉，及掃網採自台中東勢、和平梨樹、台東知本芒果的草蛉成蟲進行分析。供試蟲體置於 70% 酒精，保存於 -80 ℃冷凍櫃。

二、基因體 DNA 之製備

切取單隻草蛉的頭部，進行基因體 DNA 的萃取，胸腹部則放入 70% 酒精中，貯存於 -80 ℃ 冷凍櫃留做存證標本 (voucher specimens)。將單隻草蛉頭部放入 1.5 ml 微量離心管中，以 1.5 ml 丟棄式研磨棒磨碎後，再以 Tissue & Cell Genomic DNA Purification Kit (GeneMark, Taiwan) 萃取其 DNA。詳細流程同試劑的使用說明，最後可得 200 μl DNA 溶液。

三、基因體 DNA 之濃度

取農試所室內飼養之基徵草蛉活成蟲，雌、雄各 5 隻，以上述方法萃取 DNA 後，旋即以光譜儀 WPA Biowave Spectrophotometer S2100 (Biochrom Ltd, UK) 波長 260 nm，偵測 DNA 濃度三次。將其平均值以 SPSS (Statistical Products and Services Solutions) 軟體，進行 t 值測試法檢測，並採 $p < 0.05$ 顯著水準，比較雌、雄間之差異性。

四、18S rRNA 之增幅與定序

增幅部分 18S rRNA 片段的引子對爲 18SF：5'-GCCGCGGTAATTCCAGCT-3' 和 18SR：5'-CGGTGTGTACAAAGGGCAGGG-3' (Campbell *et al.*, 1995)。每一反應總體積爲 20 μl，內含 *Taq* Plus 0.75 U (*Taq* DNA polymerase + *Pfu* DNA polymerase)、1X reaction buffer、250 μM dNTPs (GeneMark, Taiwan)、雙向引子各 10 pmoles 及上述模板 DNA 2 μl。PCR 增幅以 Perkin-Elmer 公司的 GeneAmp® PCR System 2400 迴溫循環器進行，於 94℃ 2 min，60℃ 1 min，72℃ 1 min；隨即進行 95℃ 30 sec，60℃ 30 sec，72℃ 30 sec，30 個循環；最後以 72℃ 7 min 使其反應完全。PCR 產物以 1.4% 瓊脂凝膠 (agarose gel)，於 100 V 電壓條件下進行 30 min 電泳，結束後以溴化乙錠 (ethidium bromide, 5 μg/ml) 染色，並於紫外燈箱上觀察結果及記錄。

將上述增幅放大的 DNA 產物，由瓊脂凝膠上切下，並以 Micro-Elute DNA Clean/Extraction kit (GeneMark, Taiwan) 純化。續採用 TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, California, USA) 進行 PCR 產物基因選殖，將純化後的 DNA 接入 pCR® II-TOPO® 載體後，轉形至 ECOS™9-5 勝任細胞 (Yeastern, Taiwan) 中，利用含有 X-gal 的 LB/ampicillin 培養基初步篩選有成功轉基因的細菌選殖株，再以 LB/ampicillin 培養液於 37℃恆溫箱中大量培養，萃取其重組 DNA 質體後，以 *EcoR* I 確認有嵌入 DNA 片段的菌株，隨即將此菌液塗於 LB/ampicillin 培養基，送交源資國際生物科技股份有限公司 (Tri-I Biotech Inc., Taiwan) 以自動定序儀 (ABI 3730) 進行定序。每隻草蛉選取 3 個菌株進行雙向核酸定序，所得序列再以 Vector NTI® Suite 9.0 軟體 (Invitrogen, California, USA) 之 ContigExpress™ 程式進行整理。

五、18S rRNA 序列分析

將由 18SF/18SR 增幅所得之室內基徵草蛉及安平草蛉 18S rRNA 序列，在 NCBI 網站上，以 BLAST 程式進行序列相似性檢索，下載相似的序列後，以 Vector NTI® Suite 9.0 軟體之 AlinX® 程式進行多序列比對分析，選取這些序列的共同區域，使用 POWER 1.0 (PhylOgenetic WEb Repeater) 生物巨分子序列親緣性分析系統 (Lin *et al.*, 2005)，先以 ClustalW 1.83 進行多序列排比，再以 PHYLIP 3.5 進行親緣關係推衍，繪出 Neighbor-Joining tree，繼之以 Bootstrap analysis 做 1000 次統計分析，評估此親緣關係樹各分枝間之信賴度。

六、專一性引子設計及測試

將室內飼養而得之基徵草蛉及安平草蛉 18S rRNA 序列，以 Vector NTI® Suite 9.0 軟體之 AlinX® 程式進行多序列比對分析。再依據二者序列種間差異，設計具種專一性引子。引子合成係送交源資國際生物科技股份有限公司代爲合成。

以 2X PCR Master Mix-SuperTherm 試劑組 (JMR, UK)，進行草蛉專一性引子聚合酶連鎖反應及複合式聚合酶連鎖反應。每一反應總體積爲 20 μl，包含 2 μl 基徵草蛉或安平草蛉的模板 DNA，及 10 μl 之 2X PCR Master Mix (內含 2 U SuperTherm DNA polymerase Mix、2X buffer、400 μM dNTPs、3 mM $MgCl_2$)，及基徵草蛉專一性引子組 MBS5/MBS8，或安平草蛉專一性引子組 MDJ5/MDJ6，各 10 pmoles，對照組以水取代模板 DNA 進行反應，並進行基徵草蛉專一性引子組在安平草蛉模板 DNA，及安平草蛉專一性引子組在基徵草蛉模板 DNA 上的對照 PCR 反應。若進行複合式聚合酶連鎖反應，則分取基徵草蛉或安平草蛉的模板 DNA，在各 PCR 反應液中，同時放入上述 4 個引子，對照組以水取代模板 DNA 進行反應。PCR 增幅以 Perkin-Elmer 公司的 GeneAmp® PCR System 2400 迴溫循環器進行，於 94℃ 2 min，50℃ 1 min，72℃ 1 min；隨即進行 95℃ 30 sec，50℃ 30 sec，72℃ 30 sec，30 個循環；最後以 72℃ 7 min 使其反應完全。取 2 μl PCR 產物以 1.4% 瓊脂凝膠於 1X TBE 緩衝液中進行電泳，結束後以溴化乙錠染色，並於紫外燈箱上觀察結果及記錄。

結　果

一、基因體 DNA 之萃取

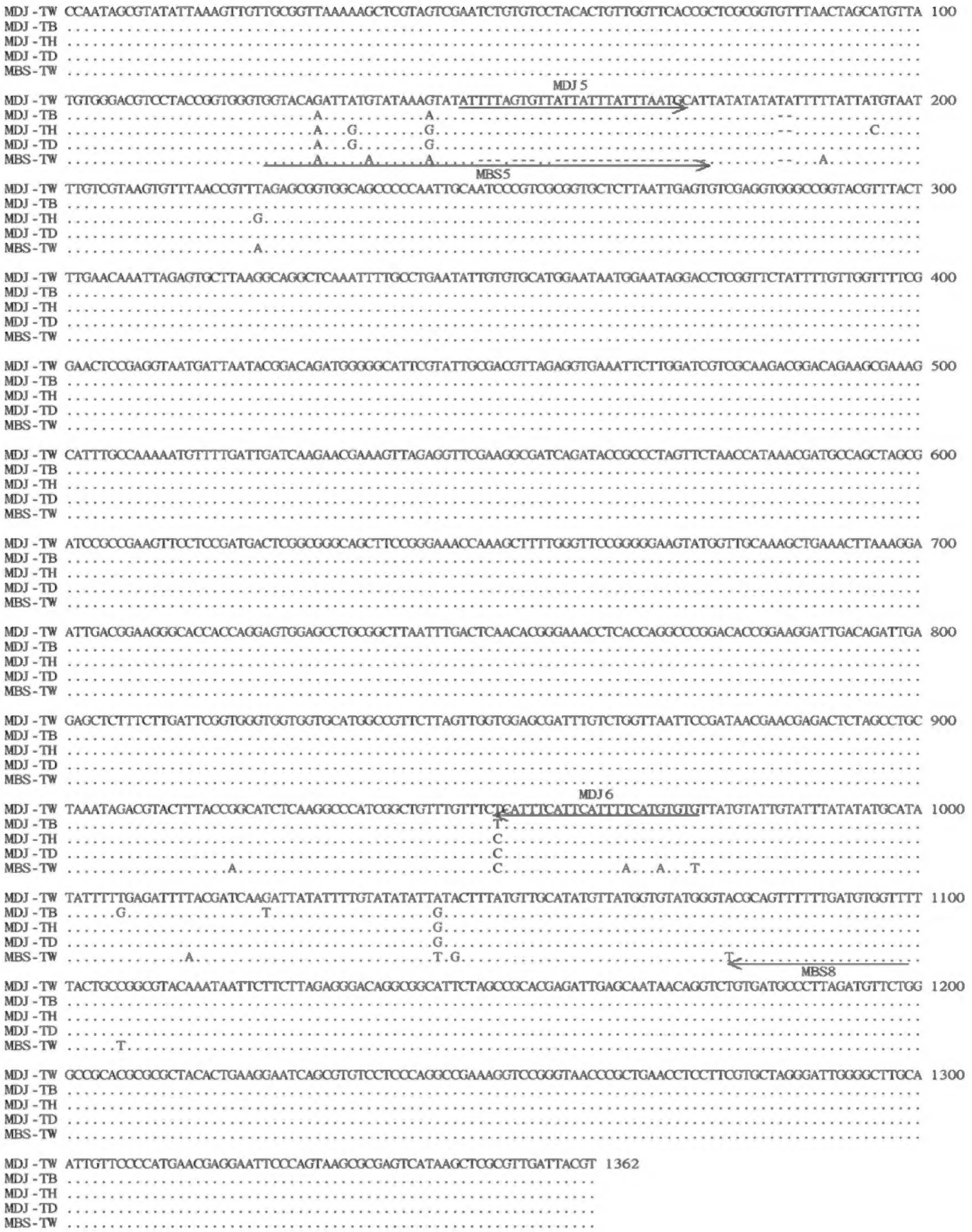
單隻基徵草蛉成蟲的頭部經萃取 DNA 後，雌蟲基因體 DNA 溶液濃度爲 6.6～11.8 ng/μl，平均 9.7 ± 0.9 ng/μl，雄蟲爲 6.3～11.6 ng/μl，平均 8.5 ± 0.9 ng/μl，雌、雄蟲間無顯著差異 (t = -0.943，df = 8，p = 0.934)。每次萃取 DNA 時，扣除殘留管壁的量仍有 184.5 ± 1.6 μl，每次只取 2 μl 進行 PCR 反應，剩餘 DNA 溶液足以爲存證 DNA 所需。

二、18S rRNA 片段序列

以 18SF/18SR 引子組，可增幅基徵草蛉及安平草蛉的部分 18S rRNA。其中在農試所室內飼養的 2 隻基徵草蛉、新竹峨眉草蜻蛉自然農業有限公司室內飼養的 6 隻草蛉序列完全相同，應都爲基徵草蛉，長度爲 1336 bp，A、T、C、G 數量各爲 334、397、260、345 bp，AT 含量爲 54.7%，已登記於 NCBI 資料庫，序號爲 EU161277。農試所室內飼養的7隻安平草蛉序列完全相同，長度爲 1362 bp，A、T、C、G 數量各爲 335、413、261、353 bp，AT 含量爲 54.9%，已登記於 NCBI 資料庫，序號爲 EU161276。自田間採得經專一性引子及鏡檢翅脈篩得之安平草蛉，與室內長期飼養之安平草蛉序列略有差異，長度在 1360～1362 bp 間。以農試所室內飼養的安平草蛉序列爲準，採自台中東勢、和平梨樹及台東卑南芒果的安平草蛉中，台中和平梨樹及台東卑南芒果上的草蛉在第 177 bp 開始的 TA repeat，少了一個 TA repeat，僅有 4 個 TA repeat，長度爲 1360 bp，採自田間的這三隻草蛉序列各與農試所室內飼養的安平草蛉另外尙有 4～5 bp 不同，序列相似值達 0.99～1.0。農試所室內飼養的安平草蛉與基徵草蛉之序列相似值則爲 0.97。詳細序列如圖一。

三、親緣關係比較

登記於 NCBI 基因庫內的 18S rRNA 片段，因各作者選擇引子位置不同，致片段略有差異，先以 Vector NTI® Suite 9.0 進行多序列初步比對後，選取這些序列的共同區域，



圖一 基徵草蛉 (MBS) 及安平草蛉 (MDJ) 之部分 18S rRNA 片段序列。相同鹼基以 “.”表示，間斷處以“-”表示，箭頭為具種專一性引子方向。TW：台中霧峰；TB：台東卑南；TH：台中和平；TD：台中東勢。

Fig. 1. Partial 18S rRNA sequences of *Mallada basalis* (MBS) and *Mallada desjardinsi* (MDJ). Dot, same nucleotide; dash, gap; arrows, the direction of species-specific primers. TW: Wufeng, Taichung; TB: Beinan, Taitung; TH: Heping, Taichung; TD: Dongshih, Taichung.

表一　進行 18S rRNA 定序分析的草蛉來源及個體數

Table 1.　List of the collection data and the number of individuals sequenced from the 18S rRNA of green lacewings

Location in Taiwan (township, county)	Crop	No. sequenced	
		Mallada basalis	*Mallada desjardinsi*
Indoors			
Wufeng, Taichung	—[1)]	2	7
Emei, Hsinchu	—[2)]	6	—
Field			
Beinan, Taitung	*Mangifera indica* L.	—	1
Dongshih, Taichung	*Pyrus serotina* Rehder	1	1
Heping, Taichung	*Pyrus serotina* Rehder	1	1

1) Reared with microcapsulated artificial diets at the laboratory of the Agricultural Research Institute.

2) Reared with the eggs of *Corcyra cephalonica* (Stainton) at the Lacewing Natural Agriculture Company.

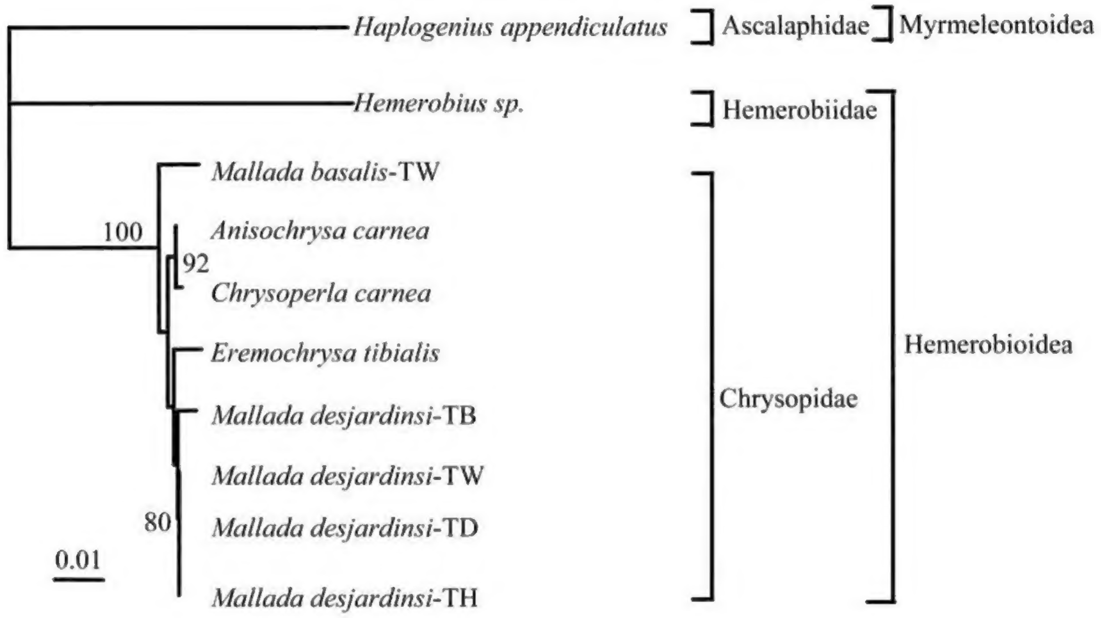
即相當於基徵草蛉第 519～1267 bp，以 POWER 1.0 繪出 Neighbor-Joining tree (圖二)，顯示草蛉科中各屬，基徵草蛉、安平草蛉、*Eremochrysa tibialis* Banks (AF423788) (Whiting, 2002b)、*Anisochrysa carnea* (Stephens) (X89482) (Chalwatzis, 1996) 及普通草蛉 *Chrysoperla carnea* (Stephens) (AY620037) (Haring and Aspöck, 2004) 皆歸爲同一群，其 Bootstrap value 爲 100，與褐蛉科 (Hemerobiidae) 的 *Hemerobius* sp. L. (U65136) (Whiting *et al.*, 1997)、蝶角蛉科 (Ascalaphidae) 的 *Haplogenius appendiculatus* (Fabricius) (AF423787) (Whiting, 2002b) 分屬不同群。其中同爲姬蛉總科 (Hemerobioidea) 之草蛉科與褐蛉科之關係，較與蟻蛉總科 (Myrmeleontoidea) 之蝶角蛉科之關係更接近。農試所室內飼養之安平草蛉與採自台中東勢、和平梨樹上之安平草蛉關係較接近，Bootstrap value 爲 80，此三者與採自台東卑南芒果葉上之安平草蛉關係略遠。*A. carnea* 及 *C. carnea* 二者關係接近，支持數值 Bootstrap value 爲 92。

四、專一性引子設計及測試

根據基徵草蛉及安平草蛉 18S rRNA 序列比對結果，在彼此序列相異處設計專一性引子，引子資料詳如表二。基徵草蛉的專一性引子組 MBS5/MBS8 可 PCR 增幅基徵草蛉 950 bp DNA 片段，安平草蛉的專一性引子組 MDJ5/MDJ6 可 PCR 增幅安平草蛉 826 bp DNA 片段 (圖三)，且對照組則皆無 PCR 反應產物，基徵草蛉專一性引子組 MBS5/MBS8 不會 PCR 增幅安平草蛉 DNA，安平草蛉專一性引子組 MDJ5/MDJ6 不會 PCR 增幅基徵草蛉 DNA。另將上述 4 個引子放入同一個 PCR 反應液中，進行複合式聚合酶連鎖反應，基徵草蛉及安平草蛉皆仍可各自 PCR 增幅出專一性片段 (圖三)，對照組則皆無 PCR 反應產物。由此結果可知，本研究所設計之具種專一性引子確具專一性及穩定性，可實際應用於此兩種草蛉之鑑定。

討　論

18S rRNA 序列具高度保守性，種內個體間的穩定性極高，常見於昆蟲科級以上層次的親緣關係探討。在此研究中，雖有確定種名之基徵草蛉及安平草蛉個體，且可憑藉



圖二　脈翅目部分 18S rRNA 片段序列，以 Kimura 2-parameter 運算模式，再經 Neighbor-Joinging 群聚方法所推導之親緣關係樹。樹形上的數值為經 1000 次 bootstrap 的值，>70% 才會顯示其上。TW：台中霧峰；TB：台東卑南；TH：台中和平；TD：台中東勢

Fig. 2. A phylogenetic tree of the Neuroptrea based on the partial 18S rRNA sequences by the Neighbor-Joining method of the pairwise distance model of Kimura 2-parameter. Bootstrap values >70% are indicated at the nodes (bootstrap analysis 1000 replicates). TW: Wufeng, Taichung; TB: Beinan, Taitung; TH: Heping, Taichung; TD: Dongshih, Taichung.

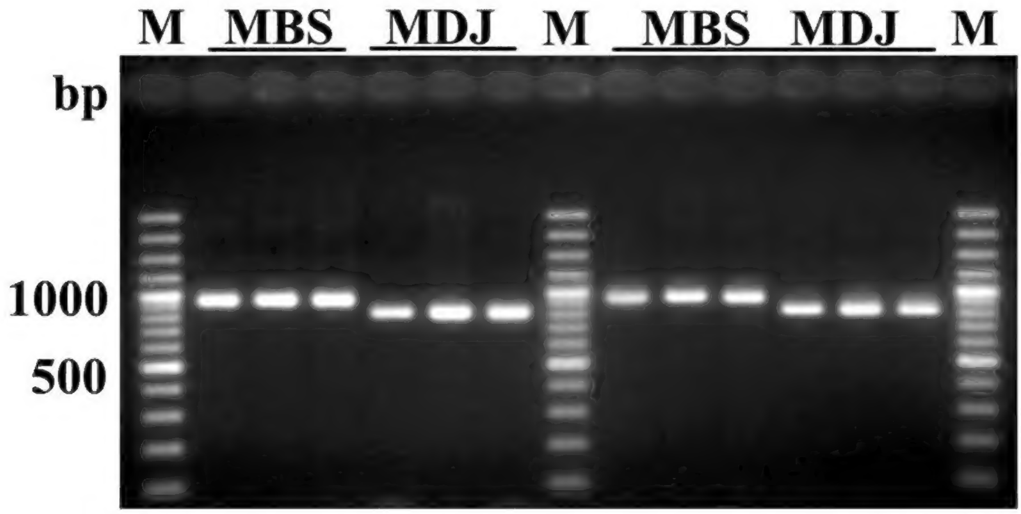
Tsukaguchi 博士描述這兩種草蛉亞前緣脈 (Sc) 及徑脈 (Rs) 癒合狀況的不同，粗分這兩種草蛉 (Tsukaguchi, 1995)，但因缺乏草蛉分類學者隨時協助外部形態的鑑定，所以選擇此高度保守之 18S rRNA 進行分析比較，以減少種內個體間之序列變異問題。也因此在種間有限的序列差異下，較不容易尋得適合的專一引子，本研究最後找到基徵草蛉及安平草蛉各自的專一引子，且可將這兩組引子放在同一個 PCR 反應中，進行複合式聚合酶連鎖反應 (multiplex PCR)，提升鑑定的效率 (Liu *et al.*, 2006)，進行一次 PCR，即可同時知道此樣本爲基徵草蛉或安平草蛉，或兩種都不是。至於若樣本非屬這兩種草蛉，則無法進一步分辨其種類，但可另以 18SF/18SR 增幅、定序，再於網路上的基因庫中，搜尋有無相同或類似序列，以推論其種名或分類群。此較 RAPD-PCR (random amplifyied polymorphic DNA-PCR) 或據此衍生之序列特徵化增幅區域 (sequence characterized amplified regions, SCARs) (Parnan and Michelmore, 1993) 方法，能提供更多物種資訊。

室內飼養的安平草蛉，與採自台中東勢、和平梨樹及台東卑南芒果三隻經專一性引子及翅脈初步認定爲安平草蛉者，序列相似值達 0.99～1.0。將之與 NCBI 資料庫草蛉科中之 *Eremochrysa tibialis*、*A. carnea*、*C. carnea* 及農試所室內基徵草蛉，選取序列共同區域

表二　基徵草蛉及安平草蛉之具種專一性引子及其增幅長度

Table 2. Species-specific primers and the size of expected DNA fragments from *Mallada basalis* and *M. desjardinsi*

Species	Primer	Nucleotide sequence (5' to 3')	expected DNA fragment size (bp)	Tm (℃)
M. basalis	MBS5	GGTACAAATTATATATAAAATATATATTT	950	46.0
	MBS8	AACCACATCAAAAAACTGCGA		48.5
M. desjardinsi	MDJ5	ATTTTAGTGTTATTATTTATTTAATGC	826	46.1
	MDJ6	CACACATGAAAATGAATGAAATGG		50.6



圖三　以基徵草蛉 (MBS) 及安平草蛉 (MDJ) 之專一性引子 MBS5/MBS8、MDJ5/MDJ6 進行具種專一性 PCR 增幅其部分 18S rRNA。M 為核酸標準標誌。MBS，只放入 MBS 之專一性引子。MDJ，只放入 MDJ 之專一性引子。MBS MDJ，MBS 和 MDJ 各同時放入上述 4 個引子。

Fig. 3. Species-specific PCR of partial 18S rRNA from *Mallada basalis* (MBS) and *M. desjardinsi* (MDJ). M, markers. MBS, MBS with its specific primers MBS5/MBS8. MDJ, MDJ with its specific primers MDJ5/MDJ6. MBS MDJ, MBS and MDJ with the 4 above primers, respectively.

749 bp，進行多序列比對分析，採自台中東勢、和平梨樹的安平草蛉與農試所室內飼養的安平草蛉序列完全相同，與採自台東卑南芒果的安平草蛉則僅有 2 bp 不同。其餘 5 種草蛉則與農試所室內飼養的安平草蛉序列有 3～9 bp 不同。據此推論採自台中東勢、和平梨樹及台東卑南芒果與室內安平草蛉序列極爲相似的這 3 隻草蛉很有可能爲安平草蛉。

但若依生物種學派 (biological species concept) 以能否自然交配產生具生殖力子代之物種定義而言，難以據此判斷是否屬於同種。而在一般昆蟲鑑定實務上，若無具體的雜交實驗驗證，此物種定義標準其實很難達到 (Bickford *et al*., 2006)。在此研究過程中，同時也發現 *Anisochrysa carnea*、*Chrysoperla carnea* 間僅有一個序列不同，而據

Tsukaguchi (1995) 報告顯示此兩種係爲同種，*Anisochrysa carnea* 爲 *Chrysoperla carnea* 的同物異名。而 Duelli (1996) 及 Charles *et al*. (2002) 研究顯示 *Chrysoperla carnea* 有隱匿種 (cryptic species) 及姊妹種 (sibling species) 的問題。因此本研究所發現安平草蛉的這些序列差異究竟是族群間的差異，或已達亞種、種間的差異層次，則仍有待更進一步的外形鑑定、生物學觀察、雜交試驗、聲音分析 (Charles, *et al*., 2002) 及更多田間樣本數及其他相似種類序列的建立等多方面的研究分析。

另由農試所室內大量飼養的基徵草蛉、新竹峨眉草蜻蛉自然農業有限公司室內飼養的草蛉或由台中東勢、和平梨樹掃網採集之基徵草蛉 18S rRNA 序列均完全相同，沒有任何差異。此或因台灣這十幾年來，農業單位在全省大面積、廣泛持續的推動以基徵草蛉進行生物防治，加以有機蔬果漸受消費者青睞，各地農民也會主動向試驗單位索取基徵草蛉，致使台灣的基徵草蛉遺傳多樣性漸趨一致，而致原就具序列高度保守性之 18S rRNA 片段序列完全無差異。但因本研究分析的基徵草蛉樣本侷限於台灣中北部，其餘地區的基徵草蛉是否也完全相同，仍有待進一步探討。

本研究採用的基因體 DNA 萃取方法，取得之基因體 DNA 溶液，基徵草蛉雌、雄間無顯著差異，皆足以進行專一性引子鑑定草蛉種類。在增幅定序 18S rRNA 時，因 *Taq* Plus (*Taq* DNA polymerase + *Pfu* DNA polymerase) 具序列校正功能，所以此時以 *Taq* Plus 進行 PCR，再進一步進行定序分析。而在進行專一性引子 PCR 測試時，則改爲使用 2X PCR Master Mix-SuperTherm 試劑組，雖此 SuperTherm DNA polymerase 無序列校正功能，但不致影響 PCR 產物進行電泳後的目視長度判別，且較爲快速、簡便，可減少人爲污染問題，加以費用較低，每一 PCR 反應僅需 6.8 元，比以 *Taq* plus 進行 PCR 反應需 17.4 元，價格較低，較適於室內大量飼養例行種類監控檢驗所需。

總之，在台灣常被應用於生物防治上的基徵草蛉，一直面臨長期室內大量飼養，欲更新族群時種類鑑定的問題，因 PCR 相關技術的蓬勃發展，執行困難度越來越低，近來此技術也已被應用室內大量飼養天敵種類的監控上。本研究根據 18S rRNA 建立之基徵草蛉及安平草蛉 DNA 鑑定特徵，因具專一性及穩定性，未來將可實際應用於基徵草蛉及安平草蛉室內大量飼養及自田間採集基徵草蛉更新室內品系時，監控、確認草蛉種類所需。

誌　　謝

本研究承行政院農業委員會 91 農科-7.2.2-農-C1 計畫經費補助。蒙農試所吳子淦副研究員提供部分室內飼養之草蛉標本，及與 Tsukaguchi 博士草蛉鑑定通訊資料。石憲宗博士協助確認安平草蛉學名，文成複蒙錢景秦博士及石憲宗博士斧正並提供意見。試驗期間承邱春美、楊侑蓁、王思涵、朱雅琳小姐協助養蟲及相關試驗執行。謹此一併致謝。

引用文獻

Bickford, D., D. J. Lohman, N. S. Sodhi, P. K. L. Ng, R. Meier, K. Winker, K. K. Ingram, and I. Das. 2006. Cryptic species as a window on diversity and conservation. Trends Ecol. Evol. 22: 148-155.

Brooks, S. J., and P. C. Barnard. 1990.

The green lacewings of the world: a generic review (Neuroptera: Chrysopidae). Bull. Br. Mus. Nat. Hist. (Entomol.) 59: 117-286.

Campbell, B. C., J. D. Steffen-Campbell, J. T. Sorensen, and R. J. Gill. 1995. Paraphyly of Homoptera and Auchenorrhyncha inferred from rDNA 18S nucleotide sequences. Syst. Entomol. 20: 175-194.

Chalwatzis, N., J. Hauf, Y. Van de Peer, R. Kinzelbach, and F. K. Zimmermann. 1996. 18S ribosomal RNA genes of insects: primary structure of the genes and molecular phylogeny of the Holometabola. Ann. Entomol. Soc. Am. 89: 788-803.

Chang, C. P. 2000. Investigation on the life history of *Mallada basalis* (Walker) (Neuroptera: Chrysopidae) and the effects of temperatures on its developments. Chinese J. Entomol. 20: 73-87. (in Chinese)

Chang, C. P., and S. C. Huang. 1995. Evaluation of the effectiveness of releasing green lacewing, *Mallada basalis* (Walker) for the control of tetranychid mites on strawberry. Plant Prot. Bull. 37: 41-58. (in Chinese)

Chang, S. C., N. T. Hu, C. Y. Hsin, and C. N. Sun. 2001. Characterization of differences between two *Trichogramma* wasps by molecular markers. Biol. Cont. 21: 75-78.

Charles, S. H., S. J. Brooks, P. Duelli, and J. B. Johnson. 2002. Discovering the true *Chrysoperla carnea* (Insecta: Neuroptera: Chrysopidae) using song analysis, morphology, and ecology. Ann. Entomol. Soc. Am. 95: 172-191.

Chou, L. Y., T. K. Wu. 1988. Notes on two *Telenomus* (Hymenoptera: Scelionidae) from *Chrysopa* (Neuroptera) eggs in Taiwan. J. Taiwan Agric. Res. 37: 340-347. (in Chinese)

Cianchi, R., and L. Bullini. 1992. New data on sibling species in chrysopid lacewings: the *Chrysoperla cranea* (Stephens) and *Mallada prasinus* (Burmeister) complexes (Insecta: Neuroptera: Chrysopidae), pp. 99-104. *In*: M. Canard, H. Aspöck, and M. W. Mansell, eds. Current Research in Neuropterology. Proceedings of the Fourth International Symposium on Neuropterology. 1991, Bagnères-de-Luchon, France.

Duelli, P. 1996. The working group “carnea-complex:” Report on activities, results and cooperative projects. pp. 307-311. *In*: M. Canard, H. Aspöck and M. W. Mansell, eds. Pure and Applied Research in Neuropterology. Proceedings of the Fifth International Symposium on Neuropterology. 1994, Cairo, Egypt.

Hao, H. H. 2002. Application of phytoseiid and chrysopid for pest control in net house orchard. Formosan Entomol. Spec. Pub. 3: 49-58. (in Chinese)

Haring, E., and U. Aspöck. 2004. Phylogeny of the Neuropterida: a first molecular

approach. Syst. Entomol. 29: 415-430.

Hölzel, H., and P. Ohm. 1992. Zoogeographical features of Madagascan Chrysopidae (Insecta: Neuroptera). pp. 167-181. *In*: M. Canard, H. Aspöck, and M. W. Mansell, eds. Current Research in Neuropterology. Proceedings of the Fourth International Symposium on Neuropterology. 1991, Bagnères-de-Luchon, France.

Hoy, M. A. 1994. Insect Molecular Genetics. Academic Press, San Diego, USA. 546 pp.

Jeyaprakash, A., and M. A. Hoy. 2002. Mitochondrial 12S rRNA sequences used to design a Molecular ladder assay to identify six commercially available phytoseiids (Acari: Phytoseiidae). Biol. Cont. 25: 136-142.

Kabissa, J. C. B., H. Y. Kayumbo, and J. G. Yarro. 1996. Seasonal abundance of chrysopids (Neuroptera: Chrysopidae) preying on *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) and *Aphis gossypii* (Glover) (Homoptera: Aphididae) on cotton in eastern Tanzania. Crop Prot. 15: 5-8.

Kjer, K. M. 2004. Aligned 18S and insect phylogeny. Syst. Biol. 53: 506–514.

Lee, S. J., and C. I. T. Shih. 1981. Biology, predation, and field-cage releasee of *Chrysopa boninensis* Okamoto on *Paurocephala psylloptera* Crawford and *Corcyra cephalonica* Stainton. Chinese J. Entomol. 1: 123-124. (in Chinese)

Lee, W. T. 1994. Technical development of microencapsulated artificial diets for *Mallada basalis* Walker. Chinese J. Entomol. 14: 47-52. (in Chinese)

Lin, C. Y., F. K. Lin, C. H. Lin, L. W. Lai, H. J. Hsu, S. H. Chen, and C. A. Hsiung. 2005. POWER: PhylOgenetic WEb Repeater – an integrated and user-optimized framework for biomolecular phylogenetic analysis. Nucleic Acids Res. 33: 553-556.

Liu, Y. C., S. C. Chang, W. H. Chen, and W. B. Shu. 2006. The application of single-step nested multiplex polymerase chain reaction for the identification of *Rhizoglyphus echinopus*, *R. robini* and *R. setosus* simultaneously. Plant Prot. Bull. 48: 101-116.

Lu, C. T., and C. L. Wang. 2006. Control effect of *Mallada basalis* on insect pests of nethouse sweet peppers. J. Taiwan Agric. Res. 55: 111-120. (in Chinese)

Mochizuki, A., H. Naka, K. Hamasaki, and T. Mitsunaga. 2006 Larval cannibalism and intraguild predation between the introduced green lacewing, *Chrysoperla carnea*, and the indigenous trash-carrying green lacewing, *Mallada desjardinsi* (Neuroptera: Chrysopidae), as a case study of potential nontarget effect assessment. Environ. Entomol. 35: 1298-1303.

Mouloud, M., N. T. Chu, P. Simo Santalla, P. Gillet, and D. Thierry. 2002. Enzymatic polymorphism in *Chrysoperla carnea* (Stephens) and *C. kolthoffi*

(Navás) (Neuroptera: Chrysopidae). Acta Zool. Hung. 48: 203–208.

Nee, H. H. 1983. Life History, Predation and Population Increase of *Chrysopa boninensis* Okamoto and Its Prey, *Myzus persicae* Sulzer. Resaerch Institute of Entomology, National Chung Hsing University. Master thesis. Taichung. 64 pp. (in Chinese)

Paran, I., and R. W. Michelmore. 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. Theor. Appl. Genet. 85: 985-993.

Ridway R. L., and W. L. Murphy. 1984. Biological control in the field. pp. 220-228. *In*: M. Canard, Y. Séméria, and T. R. New, eds. Biology of Chrysopidae. Dr. W. Junk Publishers, Hague, Netherlands.

Ruberson, J. R., C. A. Tauber, and M. J. Tauber. 1995. Developmental effects of host and temperature on *Telenomus* spp. (Hymenoptera: Scelionidae) parasitizing chrysopid eggs. Biol. Cont. 5: 245-250.

Tsukaguchi, S. 1995. Chrysopidae of Japan (Insecta, Neuroptera). S. Tsukaguchi, Osaka, Japan. 223 pp.

Wells, M. M. 1994. Small genetic distances among population of green lacewings of the genus Chrysoperla (Neuroptera: Chrysopidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 87: 737-744.

Whiting, M. F. 2002a. Phylogeny of the holometabolous insect orders: molecular evidence. Zool. Scrip. 31: 3-15.

Whiting, M. F. 2002b. Mecoptera is paraphyletic: Multiple genes and phylogeny of Mecoptera and Siphonaptera. Zool. Scr. 31: 93-104.

Whiting, M. F., J. C. Carpenter, Q. D. Wheeler, and W. C. Wheeler. 1997. The Strepsiptera problem: phylogeny of the holometabolous insect orders inferred from 18S and 28S ribosomal DNA sequences and morphology. Syst. Biol. 46: 1-68.

Wu, T. K. 1992. Feasibility of controlling citrus red spider mite, *Panpnychus citri* (Acarina: Tetranychidae) by green lacewing, *Mallada basalis* (Neuroptera: Chrysopidae). Chinese J. Entomol. 12: 81-89. (in Chinese)

Wu, T. K. 1995. Integrated control of *Phyllocnistis citrella*, *Panonychus citri*, and *Phyllocoptruta oleivora* with periodic releases of *Mallada basalis* and pesticide applications. Chinese J. Entomol. 15: 113-123. (in Chinese)

收件日期：2007 年 10 月 18 日
接受日期：2007 年 12 月 19 日

Differentiation of *Mallada basalis* (Walker) and *Mallada desjardinsi* (Navás) (Neuroptera: Chrysopidae) by 18S rRNA

Shu-Chen Chang*, Chiu-Tung Lu Division of Applied Zoology, Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture, Wufeng, Taichung, Taiwan.

ABSTRACT

Mallada basalis (Walker) and *Mallada desjardinsi* (Navás) have been studied as biological control agents in Taiwan. Of the two green lacewings, *Mallada basalis* is being mass reared and used in pest control in Taiwan. Molecular techniques were applied to characterize these two green lacewings. Their partial 18S rRNA was amplified by polymerase chain reaction. The pairwise similarity of sequences from the two species was 0.97. PCR with species-specific primers based on 18S rRNA sequences provided partial 18S products of 950 and 826 bp differentiates, allowing these two species to be readily visualized after electrophoresis. Such species-specific PCR could be used to evaluate individuals for contamination during mass rearing of *Mallada basalis*, or to confirm the identity of field-collected specimens.

Key words: *Mallada basalis*, *Mallada desjardinsi*, 18S rRNA, species-specific PCR

*Correspondence address
e-mail: scchang@wufeng.tari.gov.tw